昆 虫 学 报 Acta Entomologica Sinica, July 2014, 57(7): 777 - 786 ISSN 0454-6296

灰飞虱热激蛋白 Hsp90 基因的克隆、序列分析与表达模式

张 青[1,2], 陆明星[1], 祝树德[1,*]

(1. 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009; 2. 苏州市农业科学院, 江苏苏州 215155)

摘要:【目的】灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (Fallén)是水稻上的重要害虫,它严重影响了水稻的产量和品质,特别由其传播的水稻条纹叶枯病毒对水稻的危害甚至更为严重。灰飞虱分布广,对环境有很强的适应性。本研究旨在探讨灰飞虱对温度胁迫适应的分子机制进行了初步的探讨。【方法】本研究采用 RT-PCR 与 RACE 技术克隆了热激蛋白 Hsp90 基因的全长,利用各种生物信息方法分析了该热激蛋白的特征,实时荧光定量 PCR 技术用于研究 Hsp90 基因在不同生长发育阶段和不同温度条件下表达变化规律。【结果】我们获得一条 Hsp90 基因的 cDNA 全长序列,命名为 *LsHsp*90(GenBank 登录号为 KF660250)。*LsHsp*90 全长为 2 740 bp,编码 729 个氨基酸,等电点为 5.0,分子量为 83.7 kDa。氨基酸序列中含有 Hsp90 蛋白家族的 5 个签名序列及胞质特征序列 MEEVD。结构预测表明 LsHsp90 具有 Hsp90 蛋白家族典型的结构特征。系统进化关系分析表明它与多种昆虫的 Hsp90 序列有较高的同源性。不同发育阶段的灰飞虱体内 *LsHsp*90 表达水平处于动态的变化过程中,并在 4 龄若虫期达到最大值,最低表达量在其雌成虫阶段。不同性别的灰飞虱成虫体内 *LsHsp*90 表达量有显著差异($P = 0.008$)。高温和低温胁迫都可以诱导灰飞虱体内 *LsHsp*90 的表达,最大的表达量分别在 40℃ 和 -9℃。在 40℃ 下处理不同时间后发现, *LsHsp*90 的表达水平在处理后 0.5 h 时最高,但随着时间的延长,*LsHsp*90 的表达水平逐渐降低。而在 -4℃ 下, *LsHsp*90 的表达水平在处理后 1 h 时达到最大值。【结论】灰飞虱体内的 *LsHsp*90 可以响应温度的诱导,它可能在灰飞虱温度胁迫适应过程中起到重要的作用。

关键词: 灰飞虱; 热激蛋白 90; 基因克隆; 发育; 温度; 实时定量 PCR

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2014)07-0777-10

Cloning, sequence analysis and expression profiling of heat shock protein 90 gene in the small brown plant hopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae)

ZHANG Qing[1,2], LU Ming-Xing[1], ZHU Shu-De[1,*] (1. School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; 2. Suzhou Academy of Agriculture Sciences, Suzhou, Jiangsu 215155, China)

Abstract:【Aim】The small brown planthopper *Laodelphax striatellus* (Fallén), an important rice pest insect, feeds on rice and causes the decrease of yield and quality. Especially the rice stripe virus transmitted by *L. striatellus* induces more serious loss of rice. The small brown plant hopper is widely distributed and adapts to various environments. This study aims to clarify the molecular adaption mechanisms of *L. striatellus* under temperature stress preliminarily. 【Methods】A full-length cDNA encoding Hsp90 from *L. striatellus* was cloned using RT-PCR and RACE technique. Different bioinformatics methods were used to analyze the characteristics of Hsp90. The expression levels of the Hsp90 gene among different developmental stages and under different temperatures were detected by the real-time PCR. 【Results】The complete cDNA of *LsHsp*90 deposited in GenBank accession no. KF660250 is 2 740 bp in length, which encodes a protein of 729 amino acids, with the theoretical isoelectric point of 5.0 and molecular weight of 83.7 kDa. The amino acid sequence contains five signature sequences of Hsp90 family and a C-terminal cytoplasmic character sequence (EEVD). The LsHsp90 carries a classic Hsp90 family structural signature. The phylogenic tree demonstrated that

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD16B03); 苏州市科技支撑计划项目(SNG201204)

作者简介: 张青, 男, 1969 年生, 江苏扬州人, 博士研究生, 副研究员, 研究方向为农业昆虫与害虫治理, E-mail: zhangqingsz@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: sdzhu@yzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-04-22; 接受日期 Accepted: 2014-06-08

LsHsp90 has high homology with Hsp90 proteins from some other insect species. The real-time PCR analyses exhibited that the expression levels of *LsHsp*90 varied remarkably in different developmental stages. The mRNA level observed was the highest in the 4th instar nymphs of *L. striatellus*, the lowest in female adults, and showed significant differences between male and female adults ($P = 0.008$). The *LsHsp*90 mRNA level of *L. striatellus* could be induced by heat and cold temperature stress. The highest *LsHsp*90 mRNA level was observed at 40℃ and −9℃, respectively. At 40℃, *LsHsp*90 mRNA level reached a peak at 0.5 h after treatment, and then decreased with treatment time. However, at −4℃, the peak of *LsHsp*90 mRNA level was observed at 1 h after treatment. 【Conclusion】The *LsHsp*90 gene in *L. striatellus* responds to temperature stress, and it may play an important role in the adaption process of the pest to temperature stress.

Key words: *Laodelphax striatellus*; heat shock protein 90; gene cloning; development; temperature; real-time quantitative PCR

热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一类广泛分布,具有重要生物学意义的蛋白质。它们的主要功能是分子伴侣,参与蛋白质的合成、折叠、装配及转运等生命活动(Feder and Hofmann, 1999)。根据同源性与分子量大小,热激蛋白一般分为HSP100,HSP90,HSP70,HSP60,HSP40和小分子量热激蛋白(sHSP)等(Sørensen *et al*., 2003)。相对于其他热激蛋白,有关HSP90的研究还相对较少。而HSP90是一类在正常细胞中必不可少的蛋白质,参与信号传递、维持蛋白平衡等(Rutherford *et al*., 2007; Taipale *et al*., 2010)。另外,有研究表明HSP90还可影响生物体的进化(Queitsch *et al*., 2002)。昆虫分布广泛,对生存环境具有很强的适应性。温度是影响昆虫的发生、发展和分布最重要的因素之一(Bale *et al*., 2002; Philip *et al*., 2008)。在长期进化过程中,昆虫形成了多种手段应对温度胁迫,例如通过调节休内热激蛋白的表达来抵抗不良温度(Sørensen *et al*., 2003; 崔亚东等, 2010a, 2010b; Cui *et al*., 2010; Lu *et al*., 2014)。

灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (Fallén)属半翅目飞虱科,是水稻、玉米和小麦的重要害虫,除直接刺吸危害外,还能传播水稻条纹叶枯病毒(rice stripe virus, RSV)等引起间接危害,造成巨大的产量损失(蒲茂华, 1963;阮义理等, 1981;程兆邦等, 2002)。已有的研究表明,灰飞虱具有一定的耐高温、抗低温等抗逆能力,能在我国长江中下游水稻主产区以3-5龄若虫越冬越夏(李济宸等, 1998;孙兴全等, 2000;;刘向东等, 2006, 2007)。灰飞虱4-5龄若虫的过冷却点均在-10℃以下,表现出较强的抗寒力(刘向东等,2007)。高温不能抑制灰飞虱卵的发育,在18~30℃下卵的发育速率呈直线加快(张爱民等,2008)。但是,灰飞虱对不良温度适应的分子机制仍然不清楚。本研究从热激蛋白角度出发,探索了灰飞虱对温度胁迫适应的分子机制,通过研究获得了灰飞虱Hsp90基因的全长cDNA,并采用qRT-PCR技术比较研究了灰飞虱Hsp90基因在不同发育阶段和不同温度胁迫下的表达规律。本研究结果将为深入研究灰飞虱的温度耐受性机制奠定基础,为进一步科学合理地制定该虫的综合防治策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

扬州大学园艺与植物保护学院提供的不携带条纹叶枯病毒的灰飞虱种群,在养虫室内用武育粳7号稻苗饲养10代以上。饲养条件为26±1℃,相对湿度70%,光周期16L:8D。

1.2 灰飞虱 Hsp90 基因的克隆

1.2.1 灰飞虱总RNA提取:用自制移虫器吸取5龄灰飞虱若虫20头左右至1.5 mL无菌离心管内,迅速置于液氮罐中速冻,取出后加入到匀浆器中,按SV Total RNA(Promega)分离纯化试剂盒程序提取灰飞虱总RNA,使用琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计检测RNA的完整度、纯度与浓度。

1.2.2 Hsp90基因中间片段克隆:将经消毒无核酸酶的离心管置于冰上,参照cDNA反转录试剂盒(Thermo Fisher)步骤依次加入:2 μL模板RNA,1 μL引物oligo(dT)$_{18}$,加DEPC水至12 μL。然后在上述离心管中依次加入:5 μL M-MLV 5×Buffer,1.25 μL dNTPs Mixture(各10 mmol/L),1 μL M-MLV反转录酶和2.75 μL RNase-free ddH$_2$O。将混合物瞬时离心置于42℃温育60 min,70℃,5 min终止反应后,反应产物立即用于PCR扩增或-20℃

冻存。

根据已有半翅目昆虫 Hsp90 基因序列，设计一对简并引物 LsHsp90F_1 和 LsHsp90R_1（表 1）。在无菌 PCR 管中依次加入：2.5 μL 10×Taq Buffer，2 μL dNTPs，1 μL cDNA 模板，上下游引物各 1 μL，0.25 μL Taq 酶，用 ddH_2O 补齐至 25 μL。采用降落 PCR 技术（touch down PCR）扩增中间片段，反应体系：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，65℃ 30 s，每循环降低 1℃，72℃延伸 1 min，共 19 个循环；然后 94℃变性 30 s，45℃ 30 s，70℃延伸 1 min，共 25 个循环；72℃延伸 10 min，4℃保存。吸取 5 μL PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测，检测到目的条带后将剩余 PCR 产物全部点样，进行琼脂糖凝胶电泳，纯化回收 PCR 产物。在薄壁 PCR 管中依次加入 4 μL 2×Rapid buffer，4 μL 目的 DNA 片段，1 μL pGEM-T easy vector（Promega），1 μL T4 连接酶，简单离心后室温静置 1 h，4℃过夜。吸取 100 μL DH5α 感受态细胞加入到连接产物管中，冰上放置 0.5 h，42℃热击 90 s 后冰上放置 3 min。另取 1.5 mL 灭菌离心管，加入 1 mL LB 液体培养基，将加入感受态细胞的连接产物加入到液体培养基中，37℃300 r/min 摇菌 1 h，涂布在含 Ampicillin/X-gal/IPTG 的 LB 培养基平板上，37℃倒置过夜，挑取 6 个阳性克隆在 LB液体培养基（含 AMP+）中，37℃振荡培养过夜，菌液 PCR 初步验证后送菌液至上海英俊生物技术有限公司测序，每个片段送 3 个以上克隆进行测序。

1.2.3　Hsp90 基因 RACE 扩增：按 Clontech 公司的 RACE Amplification Kit 试剂盒要求合成 cDNA 第一链保存于 −20℃待用。根据已扩增到的灰飞虱 Hsp90 基因中间片段，分别设计 3′RACE 引物和 5′RACE 引物（表 1）。3′和 5′RACE 产物的扩增体系为：0.5 μL TaKaRa La Taq（5 U/μL），5 μL 10× La PCR Buffer Π（Mg^{2+} free），5 μL $MgCl_2$（25 mmol/L），8 μL dNTPs Mixture（各 2.5 mmol/L），2 μL 模板（cDNA），2 μL 引物（10 μmol/L），5 μL UPM（10×），22.5 μL RNase-free ddH_2O。扩增条件为：94℃ 5 min；94℃ 30 s，68℃ 30 s，72℃ 2 min，35 个循环；72℃延伸 10 min，4℃保存。PCR 产物的检测、回收、连接、转化、测序均和中间片段扩增方法一致。

1.2.4　Hsp90 基因序列拼接与分析：测序结果在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索予以确认后用 DNAMAN 拼接得到基因全长。利用 ORF Finder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html）查找 Hsp90 基因完整的开放阅读框。然后在 ORF 两侧设计引物进行基因全长验证以确认其准确性。使用 SWISS 生物信息学研究所 ExPASy 分子生物学序列分析工具包括翻译、评估 pI/MW 和 Blast 分析推导氨基酸序列。使用 MEGA5.0 软件分别采用邻接法、最小进化法、最大似然法和最大简约法 4 种方法构建灰飞虱系统进化树。

1.2.5　Hsp90 结构分析：使用蛋白同源比对识别引擎 V2.0（http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html）产生同源模型（Kelley and Sternberg，2009），采用 Phyre2 预测灰飞虱 Hsp90 的结构模型，运用 Chimera 软件调整三维模型和分子布局（Pettersen *et al*.，2004）。

1.3　不同发育阶段及不同温度胁迫下灰飞虱 Hsp90 基因表达差异分析

1.3.1　cDNA 第一链的合成：选取蜕皮或羽化后 1 d 的灰飞虱 1−5 龄若虫或雌雄成虫各 10～30 头为 1 个生物学处理，重复 3 次。不同温度处理均采用蜕皮后 1 d 的灰飞虱 4 龄若虫。高温处理（1 h）为：28℃，30℃，32℃，34℃，36℃，38℃，40℃和 42℃；另外在 40℃下分别处理 0.25，0.5，1，2，4 和 8 h。低温处理（1 h）为 21℃，16℃，11℃，6℃，1℃，−4℃和 −9℃；另外 −4℃下分别处理 0.25，0.5，1，2，4 和 8 h。所有温度处理的灰飞虱用液氮速冻后，按照 1.2.1 节方法提取 RNA，检验合格后用于反转录。反转录采用 PrimeScript RT Reagent Kit Perfect Real Time 试剂盒（Bio-Rad）的方法进行：5× iScript reaction mix 4 μL，iScript reverse transcriptase 1 μL，nuclease-free H_2O 14 μL，RNA 模板 0.5 μg。反应条件：25℃ 5 min，42℃ 30 min，85℃ 5 min。产物立即使用或 4℃保存。

1.3.2　引物设计与合成：根据灰飞虱 Hsp90 基因全长设计用于荧光实时定量 PCR 的引物一对 qLsHsp90F_1 和 qLsHsp90R_1，并根据已扩增的灰飞虱 β-actin 部分序列设计内参基因引物（表 1），送上海英俊生物技术有限公司合成。

1.3.3　实时定量分析：运用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 real-time PCR 分析。使用 CF96X PCR 仪（Bio-Rad）进行 PCR 反应，体系如下：iTaq™ Universal SYBR® Green supermix（2×）10 μL，10 μmol/L 的上下游引物各 1 μL，2 μL cDNA 模板，6 μL 灭菌 ddH_2O。反应条件为：94℃ 3 min；94℃ 30 s，Tm（*Hsp*90：59.4℃和 *β-actin*：58.5℃）30 s，40 个循环，反应结束后读取 Ct 值。使用梯度稀释的灰飞

表 1 本研究所使用引物

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence	引物用途 Use of primers
$LsHsp90F_1$	TTTGGTGTRGGTTTCTACTCRGC	中间片段扩增
$LsHsp90R_1$	GGTCCAGATGGGYTTBGTYTTG	Intermediate fragment amplification
LsRACE3′	TACACCGAGGATGAGGAGCTGAACA	3′RACE
LsRACE5′	GGGTTTCTTGTCCAGATCGGCTTTGT	5′RACE
$qLsHsp90F_1$	TCGCCAAGTCAGGAACAAAGG	Real-time PCR 检测目的基因
$qLsHsp90R_1$	CCAGGTACGCCGAGTAGAAACC	Target gene detection with real-time PCR
β-$actinF_1$	GTCTCACACACAGTCCCCATCTATG	Real-time PCR 检测内参基因
β-$actinR_1$	TCGGTCAAGTCACGACCAGC	Reference gene detection with real-time PCR

虱 cDNA 作为模板,进行 real-time PCR 扩增反应,分别制作 *Hsp*90 和 *β-actin* 不同浓度的标准曲线,结果显示 *Hsp*90 和 *β-actin* 的扩增效率相同。然后使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行相对表达量分析,即先用 *β-actin* 对 *Hsp*90 进行标准化,再用经过标准化的 *Hsp*90 Ct 值除以对照(雄成虫和 26℃)的相应值,所得倍数就是 *Hsp*90 mRNA 的相对水平。所有的数据使用 SPSS16.0 软件进行相关分析。

2 结果与分析

2.1 灰飞虱 Hsp90 基因全长扩增与序列分析

以灰飞虱的 cDNA 为模板,以简并引物 $LsHsp90F_1$ 和 $LsHsp90R_1$ 进行 PCR 扩增,获得一条约 600 bp 的特异性条带。扩增产物回收、克隆、测序后,经 Blast 比对,发现该核苷酸序列与其他昆虫的 *Hsp*90 序列具有高度相似性,推测其为灰飞虱 *Hsp*90 的中间片段,长度为 614 bp。根据该片段设计灰飞虱 Hsp90 基因 cDNA 的 RACE 引物 LsRACE3′和 LsRACE5′进行 RACE 扩增,分别得到 980 bp 3′端序列和 1 823 bp 的 5′端序列。经 DNAMAN 拼接获得一个 2 740 bp 的灰飞虱 Hsp90 基因 cDNA 序列全长,命名为 *LsHsp*90(GenBank 登录号:KF660250)。其 3′UTR 末端具有典型的 ploy A 结构,在 ploy A 上游 16 bp 处具有 1 个多聚腺苷酸结构 AATAAA(图 1)。它的开放阅读框长 2 187 bp,编码 729 个氨基酸,分子量 83.7 kD,等电点5.0。LsHsp90 具有 Hsp90 蛋白家族特征签名序列:YSNKEIFLRELISN-SSDALDKIR(第 33-55 位残基)、LGTIAKSGT(第 101-109 位残基)、IGQFGVGFYSAYLVAD(第 126-141 位残基)、IKLYVRRVFI(第 357-366 位残基)和 GVVDSEDLPLNISRE(第 383-398 位残基),在 C-末端具有 4 个保守的氨基酸 EEVD(第 726-730 位残基)(图 1)。

2.2 LsHsp90 蛋白结构分析

以酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 蛋白(PDB ID: c2cg9A)为模型,使用 Phyre 预测 LsHsp90 结构模型,两者的相似性为 83%(100% 置信度)。该模型显示 LsHsp90 蛋白包含一个氨基段区域(N-terminal domain)、中间区域(middle domain)和羧基段区域(C-terminal domain)(图 2)。

2.3 LsHsp90 系统分析

序列相似性分析表明:LsHsp90 与褐飞虱 *Nilaparvata lugens*(D5KXW7)和白背飞虱 *Sogatella furcifera*(I3UII2)的 Hsp90 氨基酸序列的一致性最高,达 93%。以人类 *Homo sapiens* Hsp90 为外群,将来自半翅目、鳞翅目、直翅目、膜翅目、缨翅目、双翅目、鞘翅目等 29 种昆虫的 Hsp90 氨基酸序列进行完全比对,基于 MEGA5.0 采用邻接法、最小进化法、最大简约法和最大似然法构建了系统发育树。获得了一致的系统发育关系,因此本文只显示用邻接法构建的系统发育树,结果表明灰飞虱与褐飞虱和白背飞虱的 Hsp90 单独聚为一支,并且所有的半翅目昆虫 Hsp90 都聚集在一起。同时,所有用于构建系统发育树的鳞翅目昆虫 Hsp90 也聚类在一起(图 3)。

2.4 不同发育阶段灰飞虱体内 *LsHsp*90 的表达变化

不同发育阶段的灰飞虱体内 *LsHsp*90 的表达水平处于动态的变化过程。随着灰飞虱龄期不断的增加,*LsHsp*90 的表达量逐渐增多,在 4 龄若虫时达到最大值。4 龄若虫体内的 *LsHsp*90 基因表达量要显著高于 5 龄若虫($F_{6,14}=7.509$; $P=0.001$)。在整个发育阶段 *LsHsp*90 的最低表达量是在雌成虫阶段,而雄成虫的 *LsHsp*90 的表达水平显著高于雌成虫($F_{6,14}=7.509$; $P=0.008$)(图 4)。

```
1     ATGGGGACATTGTTACTCAGAAAACCGAAGCTCAACGTGCGTTTCATTCGTGTTTTGTGATTTTGTGAATCTTCTTTTGTGCATATCAAG
91    ATGCCAGAAGACGTTCAGATGCAGGAAGGAGAAGTGGAGACCTTCGTCTTCCAGGCGGAGATCGCCCAGTTGATGTCTTTGATCATCAAC
1      M  P  E  D  V  Q  M  Q  E  G  E  V  E  T  F  V  F  Q  A  E  I  A  Q  L  M  S  L  I  I  N
181   ACCTTCTACTCCAACAAAGAAATCTTTCTTCGTGAATTGATCTCCAACTCTTCTGATGCGTTGGACAAAATTAGATACGAAGGTCTGACT
31     T  F  Y  S  N  K  E  I  F  L  R  E  L  I  S  N  S  S  D  A  L  D  K  I  R  Y  E  G  L  T
271   GATGCCAGCAAGTTGGAATCTGGAAAGGATCTTCAAATCAAGATCATCCCAAACAAGAATGATAGAACCCTCACCATCATTGATACTGGA
61     D  A  S  K  L  E  S  G  K  D  L  Q  I  K  I  I  P  N  K  N  D  R  T  L  T  I  I  D  T  G
361   ATTGGAATGACGAAAGCTGACCTTGTGAACAACCTGGGAACAATCGCCAAGTCAGGAACAAAGGCGTTCATGGAGGCGCTGCAGGCCGGT
91     I  G  M  T  K  A  D  L  V  N  N  L  G  T  I  A  K  S  G  T  K  A  F  M  E  A  L  Q  A  G
451   GCTGACATAGCGATGATTGGCCAGTTCGGAGTGGGTTTCTACTCGGCGTACCTGGTGGCCGACAAGGTGACTGTCACGTCGAAGCACAAC
121    A  D  I  A  M  I  G  Q  F  G  V  G  F  Y  S  A  Y  L  V  A  D  K  V  T  V  T  S  K  H  N
541   GACGACGAGCAGTACCTGTGGGAGTCCTCAGCCGGCGGATCGTTCACTGTGCGCCCCGACCACACGGAGCCCCTCGGCCGCGGCACCAAG
151    D  D  E  Q  Y  L  W  E  S  S  A  G  G  S  F  T  V  R  P  D  H  T  E  P  L  G  R  G  T  K
631   ATCGTGCTCTACATCAAGGAAGACCAGGCCGAGTTCCTGGAGGAGCGCAAGATCAAGGAGGTGGTGAAGAAGCACTCGCAGTTTATCGGC
181    I  V  L  Y  I  K  E  D  Q  A  E  F  L  E  E  R  K  I  K  E  V  V  K  K  H  S  Q  F  I  G
721   TATCCCATCAAGCTGCTCGTCGAGAAGGAGCGCGACAAGGAGTTGAGCGATGACGAAGCTGAAGAAGAGGAGGAAGAGAAGAAGAAGGAA
211    Y  P  I  K  L  L  V  E  K  E  R  D  K  E  L  S  D  D  E  A  E  E  E  E  E  E  K  K  K  E
811   GGAGAAGGCGACAAGGCTGACGAGGAGGACGACAAAACACCAAAGATCGAAGATGTCGAAGATGAGGGAGAGGAAGGCGAGAAGAAGAAA
241    G  E  G  D  K  A  D  E  E  D  D  K  T  P  K  I  E  D  V  E  D  E  G  E  E  G  E  K  K  K
901   AAGAAGAAGAAGACCGTGAAGGAGAAGTACACCGAGGATGAGGAGCTGAACAAGACAAAGCCGATCTGGACAAGAAACCCAGATGACATC
271    K  K  K  K  T  V  K  E  K  Y  T  E  D  E  E  L  N  K  T  K  P  I  W  T  R  N  P  D  D  I
991   AGCCAAGAAGAGTATGGTGAATTCTACAAGTCATTGACCAACGACTGGGAAGATCATCTGGCTGTGAAGCACTTCTCGGTGGAAGGCCAG
301    S  Q  E  E  Y  G  E  F  Y  K  S  L  T  N  D  W  E  D  H  L  A  V  K  H  F  S  V  E  G  Q
1081  CTGGAGTTCAGAGCTCTGCTGTTCGCCCCTCGTCGTGCACCCTTCGACCTGTTTGAGAACAAGAAGCGCAAGAACAACATCAAACTGTAT
331    L  E  F  R  A  L  L  F  A  P  R  R  A  P  F  D  L  F  E  N  K  K  R  K  N  N  I  K  L  Y
1171  GTGCGCAGGGTCTTCATCATGGACAACTGCGAAGACCTCATTCCCGAGTACCTGAACTTCATCAAGGGTGTAGTCGACAGTGAAGACTTG
361    V  R  R  V  F  I  M  D  N  C  E  D  L  I  P  E  Y  L  N  F  I  K  G  V  V  D  S  E  D  L
1261  CCTCTCAACATTTCTCGTGAAATGCTCCAACAGAACAAAATTCTCAAAGTCATCAGGAAGAATTTAGTCAAGAAGTGTTTGGAACTGTTT
391    P  L  N  I  S  R  E  M  L  Q  Q  N  K  I  L  K  V  I  R  K  N  L  V  K  K  C  L  E  L  F
1351  GAGGAGTTGGCTGAGGACAAAGACAACTACAAGAAGTTCTACGAACAGTTCAGCAAGAACTTGAAACTTGGTATTCACGAAGACAGCCAG
421    E  E  L  A  E  D  K  D  N  Y  K  K  F  Y  E  Q  F  S  K  N  L  K  L  G  I  H  E  D  S  Q
1441  AACAGGAAGAAACTGTCTGACCTGCTCCGCTACCACACTTCGGCTTCAGGCGATGACAGCTGCTCGCTGAAGGAATATGTCGGCCGCATG
451    N  R  K  K  L  S  D  L  L  R  Y  H  T  S  A  S  G  D  D  S  C  S  L  K  E  Y  V  G  R  M
1531  AAGGAGAACCAGAAGCACATCTACTACATCACCGGAGAGAGCAAGGACCAGGTGGCCAACTCGTCGTTTGTCGAGCTTGTCAAGAAGCGC
481    K  E  N  Q  K  H  I  Y  Y  I  T  G  E  S  K  D  Q  V  A  N  S  S  F  V  E  L  V  K  K  R
1621  GGATTCGAAGTTGTCTACATGACTGAGCCGATCGATGAGTATGTAGTGCAGCAGATGAAGGAGTACGACGGCAAGCAGCTGGTGTCCGTC
511    G  F  E  V  V  Y  M  T  E  P  I  D  E  Y  V  V  Q  Q  M  K  E  Y  D  G  K  Q  L  V  S  V
1711  ACCAAGGAGGGACTCGAACTGCCCGAAGACGAGGCCGAAAAGAAGAAGCGCGAGGATGACAAGGCCAAATTCGAGAACCTGTGCAAGGTG
541    T  K  E  G  L  E  L  P  E  D  E  A  E  K  K  K  R  E  D  D  K  A  K  F  E  N  L  C  K  V
1801  ATGAAGGACATCCTGGACAAGAAAGTGGAGAAGGTAGTGGTGAGCAACAGGCTGGTGGAGTCGCCCTGCTGCATTGTGACGTCACAGTAC
571    M  K  D  I  L  D  K  K  V  E  K  V  V  V  S  N  R  L  V  E  S  P  C  C  I  V  T  S  Q  Y
1891  GGCTGGACGGCCAACATGGAGCGTATCATGAAGGCACAGGCGCTGCGCGACACCTCCACCATGGGCTACATGGCCGCCAAGAAGCATCTG
601    G  W  T  A  N  M  E  R  I  M  K  A  Q  A  L  R  D  T  S  T  M  G  Y  M  A  A  K  K  H  L
1981  GAGATCAACCCCGACCACTCGATCATCGACACCCTGCGCGTCAAGGCCGACGAGGACAAGAACGACAAGGCGGTGAAGGACCTGGTGATG
631    E  I  N  P  D  H  S  I  I  D  T  L  R  V  K  A  D  E  D  K  N  D  K  A  V  K  D  L  V  M
2071  CTGCTGTTCGAGACGGCGCTGCTCTCGTCCGGCTTCGCCCTCGAGGACCCCGGCGTGCACGCGGCGCGCATCCACCGCATGATCAAGCTC
661    L  L  F  E  T  A  L  L  S  S  G  F  A  L  E  D  P  G  V  H  A  A  R  I  H  R  M  I  K  L
2161  GGCCTCTGCATCGAGGAGGACGACCCTGTGCCCCACGACGAGGAGAAGGTCGACGCCGAAATGCCCCCGCTCGAAGGCGAGGCTTCCGAG
691    G  L  C  I  E  E  D  D  P  V  P  H  D  E  E  K  V  D  A  E  M  P  P  L  E  G  E  A  S  E
2251  GATGCGTCGCGCATGGAGGAAGTCGATTAAACCAACCAAAGTGGTCGGTCATTCAATCCAAAAAGACTGTTCAATGTTACAAAGAGACTT
721    D  A  S  R  M  E  E  V  D  *
2341  GTACATAAACTCGAAGTTTCTCATGTGCAAAAGCTTCTGATTCAAGAAAAACTAATACTTTAATTGTATTAAAATTTATTTTGTTCATTT
2431  CTTGCTTCTTGCCCTGTAGATGTTTGATTGACTCCAGCGCAGTTTTTGAACCAGAAGCTTTTGCACAACGAGCAACGTTGTTGTAATTAA
2521  CGAAAATCGATTACGTACTAGTATTTTGATTTATACTACGATGTAAGATCTCTTTATAAGATTCGTGATTCCTTGATGTTAAATTTGTTT
2611  CGCACTGTTGAATTTGTGTTACAATTGACTAGTCGATTAGCTTTCTCTGAGTTTTGTTTCACTTTGAAACTTTTTGTATTATTCGGAATA
2701  AACCATTCCCGATTTTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

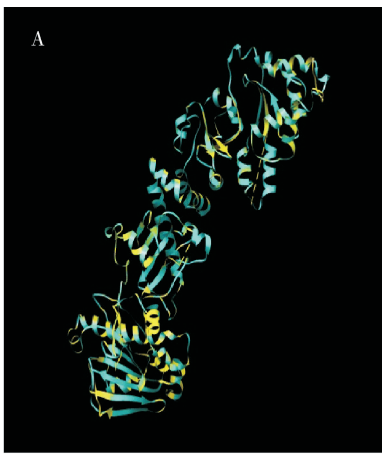
图 1　灰飞虱 Hsp90 基因的碱基序列和氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of Hsp90 gene from *Laodelphax striatellus*

粗斜体部分表示热激蛋白 90 家族特征序列；双划线部分表示细胞质 Hsp90 特征基序；单划线部分表示多聚腺甘酸信号序列（AATAAA）。The signature sequences of Hsp90 family are indicated in bold and italic, cytoplasmic Hsp90 signature motif is double underlined, and the putative polyadenylation signal (AATAAA) is underlined.

2.5　不同温度胁迫下灰飞虱 4 龄若虫体内 *LsHsp*90 的表达变化

不管高温还是低温都可以诱导灰飞虱体内 *LsHsp*90 的表达。高温和低温的表达趋势不完全一致。随着温度的不断升高，*LsHsp*90 的表达量持续增加，并在 40℃ 达到最大值，是 26℃ 时表达量的 6.78 倍。随着温度的降低，*LsHsp*90 的表达量不断增加，并在 －9℃ 达到最大值，是 26℃ 时的 4.64 倍。*LsHsp*90 在 36℃时的表达量显著高于 26℃ 的表达量（$F_{15,31} = 3.960$；$P = 0.020$）。同时，*LsHsp*90 在 21℃ 时的表达量显著低于 1℃ 的表达量（$F_{15,31} = 3.960$；$P = 0.005$）（图 5）。



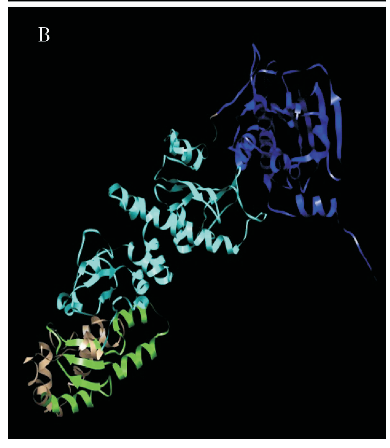


图 2 灰飞虱 Hsp90 的结构预测

Fig. 2 Structure of Hsp90 from *Laodelphax striatellus*

A：以酵母菌 HSP90（PDB ID：c2cg9A）（黄色）为模板，用 Phyre2 预测灰飞虱 HSP90 的结构模型（蓝绿色）Homology modeling of Hsp90 from *L. striatellus* (cyan) was predicted with yeast Hsp90 (PDB ID: c2cg9A) (yellow) as the template using Phyre2 software; B：灰飞虱 Hsp90 结构分为氨基端（蓝色）、中间部分（蓝绿色）和羧基端（青色）Three-dimensional structure of Hsp90 from *L. striatellus* includes N-terminal domain (in blue), middle domain (in cyan) and C-terminal domain (in green).

2.6 不同持续时间高低温胁迫下灰飞虱 4 龄若虫体内 *LsHsp90* 的表达变化

灰飞虱 4 龄若虫在 40℃条件下，经过不同持续时间处理后发现 *LsHsp*90 的表达水平在处理后 0.5 h 时达到最大值，是对照的 10.94 倍，并且显著高于处理后 2 h 时的表达水平（$F_{6,14} = 11.625$；$P < 0.001$）；随着处理时间的延长，*LsHsp*90 的表达水平逐渐降低。然而，在 -4℃下不同持续时间处理后，*LsHsp*90 的表达模式与 40℃不同，*LsHsp*90 的表达量在处理后 1 h 时达到最大值，显著高于处理后 0.5 h 时的表达量（$F_{6,14} = 18.735$；$P < 0.001$）；但 2 - 8 h 时间段的处理并没有显著诱导 *LsHsp*90 的表达（$P > 0.05$）（图 6）。

3 讨论

灰飞虱是我国长江流域重要的水稻害虫，近几年该虫仍在局部地区对水稻造成严重为害甚至绝收。因为气候变化的影响，越来越多的极端温度不断出现（Diffenbaugh *et al.*, 2005）。灰飞虱对温度的适应能力逐渐增强（张爱民等, 2008），但是其中的分子机制还鲜有报道。而热激蛋白是一类应对环境胁迫的重要蛋白（Sonoda *et al.*, 2006; Rinehart *et al.*, 2007）。本研究利用 RT-PCR 和 RACE 技术成功克隆得到第一个灰飞虱 Hsp90 基因 cDNA 全长序列，将其命名为 *LsHsp*90。它的氨基酸推导序列具有 5 个 Hsp90 蛋白家族的特征序列，C 端最末端拥有高度保守的基序 EEVD，表明此 HSP90 是细胞质热激蛋白家族成员（Gupta, 1995）。灰飞虱 LsHsp90 的结构预测也表明其具有 Hsp90 蛋白家族保守的典型结构组成（Ali *et al.*, 2006）。由于昆虫的 Hsp90 蛋白高度保守，因此它们常常用于物种间的系统进化分析。本研究也表明 LsHsp90 与其他物种的 Hsp90 蛋白具有高度的相似性。利用包括灰飞虱在内的 29 种昆虫的 Hsp90 全长氨基酸序列进行的系统发育分析结果表明，用于构建系统进化树的 27 种昆虫都按照传统方法获得的系统发育关系聚类，这说明 Hsp90 基因可以作为用于物种系统进化分析的分子标记基因。

已有研究发现热激蛋白在调控昆虫生长发育方面起到重要的作用（Geneviève and Robert, 2003; Sharma *et al.*, 2007）。在整个发育阶段灰飞虱 *LsHsp*90 表达量在 4 龄若虫时达到最大值，这与该昆虫以 3 - 4 龄若虫越冬、越夏相吻合。*LsHsp*90 的最低表达量是在雌成虫阶段，而 Shu 等（2011）在斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 中发现 Hsp90 基因的最高表达是在成虫阶段。也有一些研究发现 Hsp90 基因在昆虫的整个发育阶段没有发生显著的变化（Sonoda *et al.*, 2006）。可见 Hsp90 蛋白在不同昆虫生长发育中有着种的特异性，每种昆虫的 Hsp90 蛋白都有其不同的生物功能。有趣的是 *LsHsp*90 的表达存在性别差异，类似的现象也在水稻二化螟 *Chilo suppressalis* 中被发现（Lu *et al.*, 2014）。Hsp90 蛋白可能还参与昆虫的生殖调控，其在灰飞虱中的这类作用机制仍需进一步研究。

Hsp90 是真核细胞中最丰富的蛋白质之一，一些研究已经证实了热激蛋白在抵抗冷热胁迫中的作

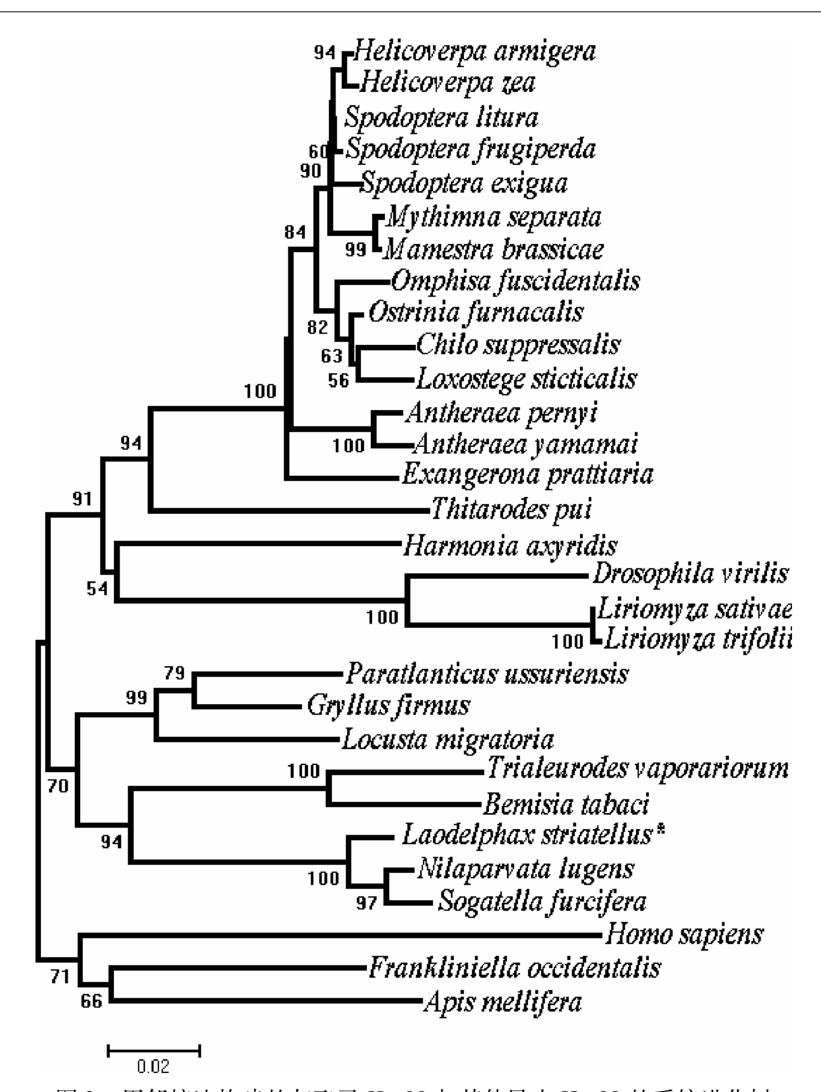


图 3　用邻接法构建的灰飞虱 Hsp90 与其他昆虫 Hsp90 的系统进化树

Fig. 3　Neighbour-joining phylogenetic tree of the Hsp90 proteins from *Laodelphax striatellus* and other insects

各分支上的数字为自引导值(1 000 次重复)(仅显示 >50 的值) Numbers on the branches are the bootstrap values obtained from 1 000 replicates (only bootstrap values >50 are shown). Hsp90 的来源及登录号 Origin of Hsp90 proteins and their accession numbers: 人类 *Homo sapiens* (P08238); 灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (KF660250); 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (D5KXW7); 白背飞虱 *Sogatella furcifera* (I3UII2); 乌苏里拟寰螽 *Paratlanticus ussuriensis* (J7FXV7); 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (C4P3Q0); 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (E0XJK5); 粘虫 *Mythimna separata* (E0XJK7); 二化螟 *Chilo suppressalis* (Q3V6C6); 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (E0XJK4); 甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* (Q0KKB5); 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (Q9GQG6); 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (E0XJL0); 美国棉铃虫 *Helicoverpa zea* (C8CCR2); 草地螟 *Loxostege sticticalis* (A8WE29); 焦点滨尺蛾 *Exangerona prattiaria* (E0XJK6); 竹蠹螟 *Omphisa fuscidentalis* (A5A3D8); 西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (L7VXD3); 柞蚕 *Antheraea pernyi* (D5JAK9); 蒲氏钩蝠蛾 *Thitarodes pui* (D2KCJ2); 天蚕 *Antheraea yamamai* (Q75NF6); 温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (B5TGR4); 异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (B8Y999); 东亚飞蝗 *Locusta migratoria* (Q6SXP5); 沙蟋 *Gryllus firmus* (E2IPC5); 西方蜜蜂 *Apis mellifera* (C1JYH6); 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (E2GLM5); 果蝇 *Drosophila virilis* (195376387); 美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* (Q5I5Q4); 三叶草斑潜蝇 *Liriomyza trifolii* (M4WR12).

用(Rinehart and Denlinger, 2000; Yi *et al.*, 2007; Košťál and Borovanska, 2009; Ma *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012)。高温和低温胁迫都可以显著诱导灰飞虱 4 龄若虫体内 *LsHsp*90 的表达,最大的表达量分别在 40 和 −9℃。翟会芳等(2010)的研究也表明 Hsp90 在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 高温胁迫中有明显的保护作用。高温瞬时热激能诱导 B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* 和温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* Hsp90 基因迅速提高表达,说明 Hsp90 在两种粉虱高温胁迫中起到一定作用(余昊和万方浩, 2009)。南极摇蚊 *Belgica antarctica* 体内的 Hsp90 基因能够持续上调来保护冷激对幼虫的伤害(Rinehart *et al.*, 2006)。而低温诱导了马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 成虫的Hsp90基因的下调

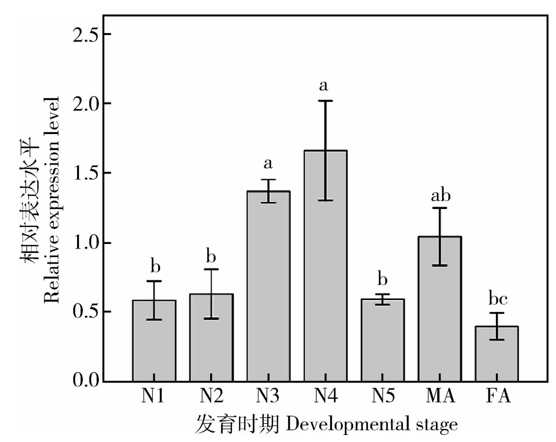


图 4 不同发育阶段的灰飞虱 *LsHsp*90 mRNA 的相对表达水平

Fig. 4　Relative expression levels of *LsHsp*90 mRNA in different developmental stages of *Laodelphax striatellus*

N1: 1 龄若虫 1st instar nymph; N2: 2 龄若虫 2nd instar nymph; N3: 3 龄若虫 3rd instar nymph; N4: 4 龄若虫 4th instar nymph; N5: 5 龄若虫 5th instar nymph; MA: 雄成虫 Male adult; FA: 雌成虫 Female adult. 每个处理 3 个重复,图中数据为平均值 ± 标准差;柱上不同的字母表示在 0.05 水平上有显著差异 (LSD 多重比较检验)。Each treatment includes three replicates. The data are denoted as mean ± *SE*. Different letters stand for the significant difference at the 0.05 level (LSD multiple comparison test).

(蒋健等, 2013)。在 40℃ 下处理不同时间后发现, *LsHsp*90 的表达水平在处理后 0.5 h 时最高,随着时间的延长,*LsHsp*90 的表达水平逐渐降低。类似的现象也在苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 中发现(申建茹等, 2011)。当遇到高温胁迫后昆虫会主动上调 Hsp90蛋白来应对,但是随着热激时间的延长热激蛋白不断积累,而大量表达热激蛋白需要昆虫消耗大量的能量物质,此时昆虫为了维持基本的生命活动而下调 Hsp90,但是表达量还是要高于正常条件下的 Hsp90 表达量(Silbermann and Tatar, 2000)。在 -4℃ 条件下,*LsHsp*90 的表达量在处理后 1 h 时达到最大值,随后降低。因此,我们认为 *LsHsp*90 可能在灰飞虱抵抗温度胁迫过程中起到关键的作用。

灰飞虱是重要的水稻害虫,长期以来由它引起的为害严重影响了水稻的产量和品质。作为一种本地越冬越夏的害虫,对温度胁迫的耐受能力直接影响其种群的消长。为了探讨灰飞虱对环境的适应机制,本研究成功克隆了其 Hsp90 基因全长序列,分析了不同发育阶段 *LsHsp*90 的表达变化规律,检测了冷热条件下 *LsHsp*90 的表达水平,阐明了 *LsHsp*90 可能与其温度适应能力有着密切的联系。当然灰飞虱体内还有其他热激蛋白,为了进一步深入探讨它的环境适应机制,有必要对其他热激蛋白进行进一步研究。通过系统阐明热激蛋白家族在灰飞虱环境适应中的作用机制,将会给该虫的发生及暴发成灾机制提供新的理论,并为开展灰飞虱综合治理提供新的思路。

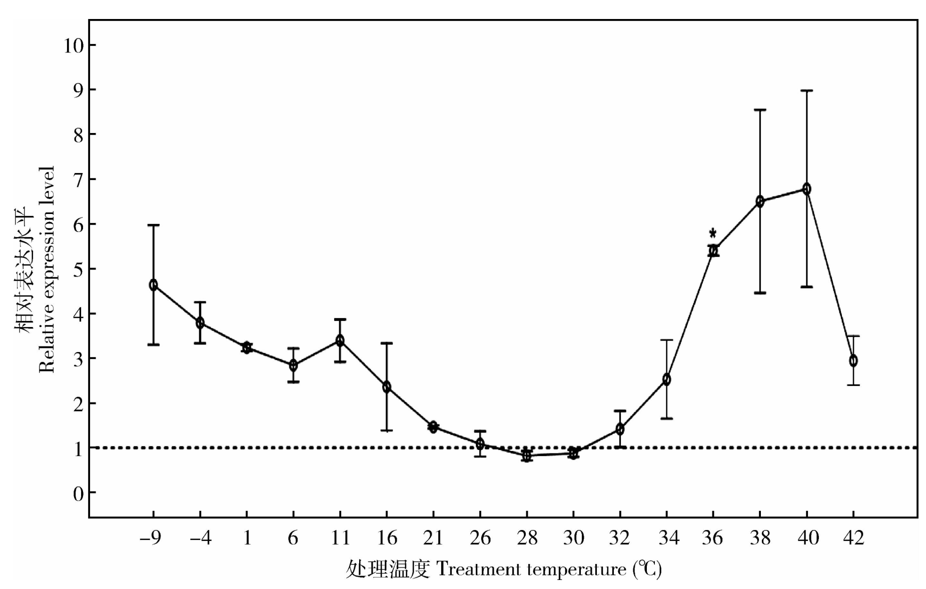


图 5　不同温度 1 h 处理后灰飞虱 4 龄若虫 *LsHsp*90 mRNA 的相对表达水平

Fig. 5　Relative expression levels of *LsHsp*90 mRNA in the 4th instar nymphs of *Laodelphax striatellus* exposed to different temperature for 1 h

每个处理 3 个重复,图中数据为平均值 ± 标准差;星号表示该处理与对照(26℃)比较在 0.05 水平上有显著差异 (LSD 多重比较检验);图 6 同。Each treatment includes three replicates. The data in the figure are mean ± *SE*. The asterisk stands for significant difference between the treatment and the control (26℃) at the 0.05 level (LSD multiple comparison test). The same for Fig. 6.

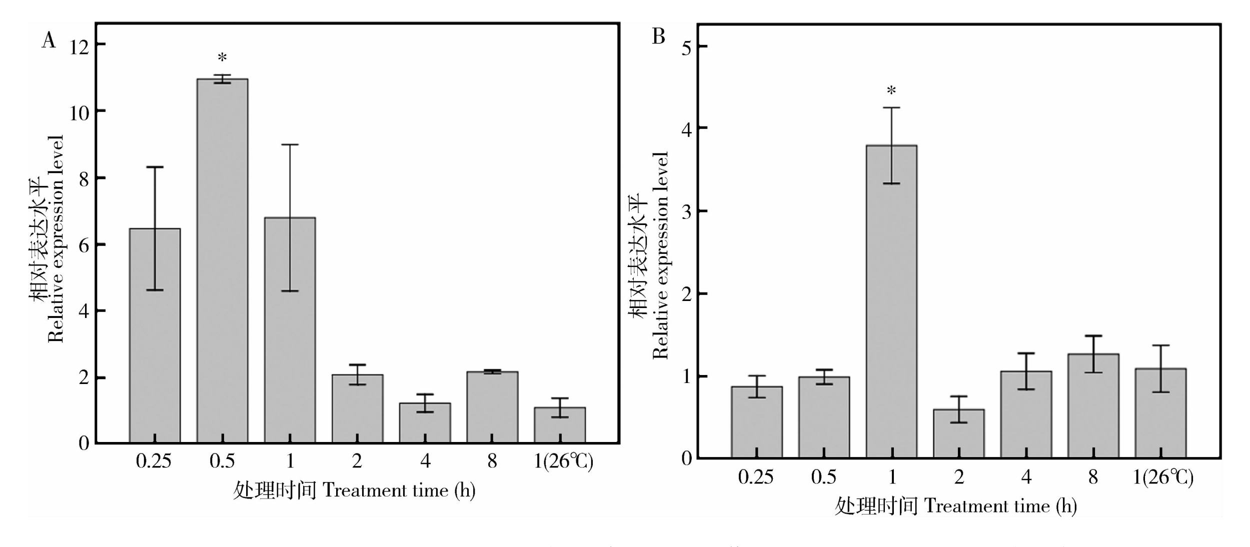


图 6　40℃(A)和 -4℃(B)下处理不同时间灰飞虱 4 龄若虫 *LsHsp*90 mRNA 的相对表达水平

Fig. 6　Relative expression levels of *LsHsp*90 mRNA in the 4th instar nymphs of *Laodeiphax striatellus* exposed to 40℃ (A) and -4℃ (B) for different time

参考文献（References）

Ali MMU, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH, 2006. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature*, 440: 1013-1017.

Bale JS, Masters GJ, Hodkinson ID, Awmak C, Bezemer TM, Brown V, Butterfield J, Buse A, Coulson JC, Farrar J, Good JEG, Hartley R, Jones TH, Lindroth RL, Press MC, Symrnioudis I, Watt A, Whittaker JB, 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology*, 8(1): 1-16.

Cheng ZB, Yang RM, Zhou YJ, Diao CY, Xiong RY, 2002. The new rule of the occurrence of rice stripe disease in Jiangsu. *Jiangsu Agricultural Sciences*, (1): 39-41. [程兆邦, 杨荣明, 周益军, 刁春友, 熊如意, 2002. 江苏稻区水稻条纹叶枯病发生新规律. 江苏农业科学, (1): 39-41]

Cui YD, Du YZ, Lu MX, Hu MZ, 2010a. Effect of thermal stress on the generation of ROS, Hsp90 and apoptosis in haemocytes of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 53(7): 721-726. [崔亚东, 杜予州, 陆明星, 胡茂志, 2010a. 热胁迫对二化螟幼虫血淋巴细胞内活性氧、Hsp90 表达及细胞凋亡的影响. 昆虫学报, 53(7): 721-726]

Cui YD, Du YZ, Lu MX, Qiang CK, 2010. Cloning of the heat shock protein 60 gene from the stem borer, *Chilo suppressalis*, and analysis of expression characteristics under heat stress. *Journal of Insect Science*, 10: 1-13.

Cui YD, Lu MX, Du YZ, 2010b. Cloning of the heat shock protein 70 gene from *Chilo suppressalis* and the analysis of its expression characteristics under heat stress. *Acta Entomologica Sinica*, 53(8): 841-848. [崔亚东, 陆明星, 杜予州, 2010b. 二化螟热休克蛋白 70 基因的克隆及热胁迫下的表达分析. 昆虫学报, 53(8): 841-848]

Diffenbaugh NS, Pal JS, Trapp RJ, Giorg F, 2005. Fine-scale processes regulate the response of extreme events to global climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44): 15774-15778.

Feder ME, Hofmann GE, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61(1): 243-282.

Gupta RS, 1995. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Molecular Biology and Evolution*, 12(6): 1063-1073.

Jiang J, Li XR, Zhang YH, Guo WC, Cheng DF, 2013. cDNA cloning of heat shock protein 90 (*Ld-hsp*90) in *Leptinotarsa decemineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) and its expression under temperature stress. *Acta Phytophylacica Sinica*, 40(5): 399-406. [蒋健, 李祥瑞, 张云慧, 郭文超, 程登发, 2013. 马铃薯甲虫热激蛋白基因 *Ld-hsp*90 的克隆及温度胁迫下的表达. 植物保护学报, 40(5): 399-406]

Kelley LA, Sternberg MJE, 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, 4(3): 363-371.

Koštál V, Tollarová-Borovanská M, 2009. The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus*. *PLoS ONE*, 4(2): e4546.

Li JC, Li GZ, Gao LQ, Li QS, 1998. Study on the occurrence of *Laodelphax striatellus*. *Beijing Agricultural Sciences*, 16(6): 24-27. [李济宸, 李桂珍, 高立起, 李青松, 1998. 灰飞虱发生规律的研究. 北京农业科学, 16(6): 24-27]

Liu XD, Zhai BP, Hu ZG, 2007. Effects of rice type and temperature on population of the rice small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(3): 348-352. [刘向东, 翟保平, 胡自强, 2007. 高温及水稻类型对灰飞虱种群的影响. 昆虫知识, 44(3): 348-352]

Liu XD, Zhai BP, Liu CM, 2006. Outbreak reasons of *Laodelphax striatellus* population. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(2): 141-146. [刘向东, 翟保平, 刘慈明, 2006. 灰飞虱种群暴发成灾原因剖析. 昆虫知识, 43(2): 141-146]

Lu MX, Hua J, Cui YD, Du YZ, 2014. Five small heat shock protein genes from *Chilo suppressalis*: characteristics of gene, genomic organization, structural analysis and transcription profiles. *Cell Stress and Chaperones*, 19(1): 91 –104.

Lu MX, Liu ZX, Cui YD, Du YZ, 2014. Expression patterns of three heat shock proteins in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 107(3): 667 –673.

Ma KX, Chen GW, Liu DZ, 2012. cDNA cloning of heat shock protein 90 gene and protein expression pattern in response to heavy metal exposure and thermal stress in planarian *Dugesia japonica*. *Molecular Biology Reports*, 39(6): 7203 –7210.

Morrow G, Tanguay RM, 2003. Heat shock proteins and aging in *Drosophila melanogaster*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 14(5): 291 –299.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE, 2004. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13): 1605 –1612.

Philip BN, Yi SX, Elnitsky MA, Lee RE, 2008. Aquaporins play a role in desiccation and freeze tolerance in larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *Journal of Experimental Biology*, 211(7): 1114 –1119.

Pu MH, 1963. A preliminary study on the small brown planthopper, *Delphacodes striatella* Fallén in the south of Kiangsu. *Acta Entomologica Sinica*, 12(2): 117 –136. [蒲茂华, 1963. 苏南灰稻虱(*Delphacodes striatella* Fallén)的初步研究. 昆虫学报, 12(2): 117 –136]

Queitsch C, Sangster TA, Lindquist S, 2002. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, 417(6889): 618 –624.

Rinehart JP, Denlinger DL, 2000. Heat-shock protein 90 is down-regulated during pupal diapause in the fresh fly, *Sarcophagus crassipalpis*, but remains responsive to thermal stress. *Insect Molecular Biology*, 9(6): 641 –645.

Rinehart JP, Hayward SAL, Elnitsky MA, Sandro LH, Lee RE, 2006. Continuous up-regulation of heat shock proteins in larvae, but not adults, in a polar insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(38): 14225 –14227.

Rinehart JP, Li AQ, Yocum GD, Robich RM, Hayward SAL, Denlinger DL, 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27): 11130 –11137.

Ruan YL, Chiang WL, Lin RF, 1981. Studies on the rice virus vector small brown planthopper *Laodelphax striatellus* Fallén. *Acta Entomologica Sinica*, 24(3): 283 –290. [阮义理, 蒋文烈, 林瑞芬, 1981. 稻病毒病介体昆虫灰稻虱的研究. 昆虫学报, 24(3): 283 –290]

Rutherford S, Knapp JR, Csermely P, 2007. Hsp90 and developmental networks. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 594: 190 –197.

Sharma S, Rohilla MS, Tiwari PK, 2007. Developmental and hyperthermia-induced expression of the heat shock proteins HSP60 and HSP70 in tissues of the housefly *Musca domestica*: an in vitro study. *Genetics and Molecular Biology*, 30(1): 159 –168.

Shen JR, Li MF, Chen NZ, Wang JJ, Wan FH, 2011. Cloning and analysis of the expression characteristics under heat stress of Hsp90 gene in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(11): 1236 – 1248. [申建茹, 李明福, 陈乃中, 王进军, 万方浩, 2011. 苹果蠹蛾热激蛋白 Hsp90 基因的克隆及热胁迫下的表达分析. 昆虫学报, 54(11): 1236 –1248]

Shu YH, Du Y, Wang JW, 2011. Molecular characterization and expression patterns of *Spodoptera litura* heat shock protein 70/90, and their response to zinc stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 158(1): 102 –110.

Silbermann R, Tatar M, 2000. Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 54(6): 2038 –2045.

Sonoda S, Ashfaq M, Tsumuki H, 2006. Cloning and nucleotide sequencing of three heat shock protein genes (*hsp*90, *hsc*70, and *hsp*19.5) from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and their expression in relation to developmental stage and temperature. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 62(2): 80 –90.

Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letter*, 6(11): 1025 –1037.

Sun XQ, Wu JJ, Wu AZ, Zhi YE, 2000. Studies on the bionomics of *Laodelphax striatellus* (Fallen). *Journal of Shanghai Agricultural College*, 18(2): 150 – 154. [孙兴全, 吴静菊, 吴爱忠, 支月娥, 2000. 灰飞虱生物学特性研究. 上海农学院学报, 18(2): 150 –154]

Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S, 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(7): 515 –528.

Yi SX, Moore CW, Lee REJr, 2007. Rapid cold-hardening protects *Drosophila melanogaster* from cold-induced apoptosis. *Apoptosis*, 12(7): 1183 –1193.

Yu H, Wan FH, 2009. cDNA cloning and phylogenetic analysis of the heat shock protein 90 gene (*hsp*90) in two whiteflies, *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotype B and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(4): 363 –371. [余昊, 万方浩, 2009. B 型烟粉虱和温室白粉虱热激蛋白 90 基因(*hsp*90)的全长 cDNA 克隆与系统发育分析. 昆虫学报, 52(4): 363 –371]

Yu H, Wan FH, Guo JY, 2012. Different thermal tolerance and hsp gene expression in invasive and indigenous sibling species of *Bemisia tabaci*. *Biological Invasions*, 14(8): 1587 –1595.

Zhai HF, Jiang XF, Luo LZ, 2010. Cloning and expression of HSP90 cDNA in larvae of the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidotera: Noctuidae) under high temperature stress. *Acta Entomologica Sinica*, 53(1): 20 –28. [翟会芳, 江幸福, 罗礼智, 2010. 甜菜夜蛾 HSP90 基因克隆及高温胁迫下其表达量的变化. 昆虫学报, 53(1): 20 –28]

Zhang AM, Liu XD, Zhai BP, Gu XY, 2008. Influences of temperature on biological characteristics of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Fallén) (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(6): 640 –645. [张爱民, 刘向东, 翟保平, 顾晓莹, 2008. 温度对灰飞虱生物学特性的影响. 昆虫学报, 51(6): 640 –645]

(责任编辑: 赵利辉)